

## ПОЛИФАЗНЫЙ ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ШТАММА *PSEUDOMONAS* SP. 2303

**В.В. Клочко, Е.О. Чугунова, Л.В. Авдеева**

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина  
e-mail: [vvklochko@ukr.net](mailto:vvklochko@ukr.net)

**Цель.** Определение таксономического статуса штамма *Pseudomonas* sp. 2303 и изучение его биологической активности. **Методы.** Выделение бактериальной ДНК, амплификация и сиквенс гена 16S рРНК, изучение культуральных, морфологических, физиолого-биохимических свойств и антагонистической активности. Трансмиссионная электронная микроскопия, газовая хромато-масс-спектрометрия. **Результаты.** Филогенетический анализ последовательности гена 16S рРНК штамма *Pseudomonas* sp. 2303 (1334 п.н.) и представителей рода *Pseudomonas* выявил 100 % идентичности с геном типового штамма *P. synxantha* ATCC 9890<sup>T</sup>, а также с флюоресцирующими видами *P. gessardii* и *P. libanensis*. Последние отличались от исследуемого штамма по своим фенотипическим свойствам. Анализ жирнокислотного состава показал, что *Pseudomonas* sp. 2303 имеет в своем составе характерные для псевдомонад C16:0, C16:1, C18:1, 2ОН C12:0 кислоты, содержание которых было сходно с таковым у типового штамма *P. synxantha*. Штамм *Pseudomonas* sp. 2303 обладал высокой антагонистической активностью по отношению к бактериям и грибам. **Выводы.** На основании результатов полифазного таксономического анализа изучаемый штамм *Pseudomonas* sp. 2303 был отнесен к виду *P. synxantha* и включен в Украинскую Коллекцию Микроорганизмов как *P. synxantha* УКМ В-399 (сиквенс задепонирован в Genbank под номером MF196188). Предложен ряд диагностических признаков (синтез феназин-1-карбоновой кислоты, неспособность к образованию левана из сахарозы, усвоение некоторых источников углерода), позволяющих отличать вид *P. synxantha* от близкородственных ему видов.

**Ключевые слова:** полифазный таксономический анализ, виды *Pseudomonas synxantha*, *P. gessardii*, *P. libanensis*, жирнокислотный состав, антагонизм, синтез феназин-1-карбоновой кислоты.

Аэробные бактерии рода *Pseudomonas* – важная в научном и практическом отношении гетерогенная группа микроорганизмов. Разнообразие биосинтетических реакций, высокая скорость роста, особенности генетической организации и синтез биологически активных соединений позволяют рассматривать бактерии этого рода как перспективный объект для работ в области биотехнологии: для стимуляции роста растений, в биологической защите от возбудителей бактериальных и грибных болезней сельскохозяйственных культур и в медицинской практике [1, 2].

На протяжении нескольких последних десятилетий наблюдается активное изучение биологии и систематики бактерий *Pseudomonas*. В настоящее время 213 видов *Pseudomonas* приведены в списке «List of

Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature», но только 147 видов *Pseudomonas* принимаются в фактической таксономии [3, 4]. Результаты гибридизации нуклеиновых кислот, данные секвенирования рибосомальных РНК и геномов, а также ряд других подходов к эволюции микроорганизмов способствовали выяснению таксономической структуры этого рода. Общеизвестным в последние годы является полифазный подход, направленный на интеграцию фенотипической, генотипической и филогенетической информации для классификации и идентификации бактерий [5].

Особое место среди представителей псевдомонад занимают бактерии флюоресцирующей группы, синтезирующие желто-зеленый флюоресцирующий пигмент. Обращает на себя внимание высокая антибиотическая активность этой группы псевдомонад, в которой находится большое количество антагонистов широкого спектра действия, угнетающих бактерии, грибы и фитонематоды.

В результате изучения антагонистических свойств ряда видов *Pseudomonas*, представленных в Украинской коллекции микроорганизмов (УКМ) и коллекции отдела антибиотиков ИМВ НАНУ, нами был выявлен штамм *Pseudomonas* sp. 2303 с широким спектром действия, выделенный в 1969 году в Бориславе (Львовская обл.). Ранее по данным фенотипического анализа штамм был отнесен к виду *P. fluorescens*. Более детальное изучение этого микроорганизма, обладающего разнообразной активностью, потребовало его таксономической ревизии.

Целью настоящей работы был полифазный таксономический анализ штамма *Pseudomonas* sp. 2303 и изучение его биологической активности.

**Материалы и методы.** Объектом исследования был штамм *Pseudomonas* sp. 2303, изолированный в 1969 г. из скважины бальнеологического источника в г. Борислав (Львовская обл.).

**Генетические исследования.** Бактериальную ДНК выделяли из суточной клеточной культуры с помощью набора «ДНК-сорб В» («Ампли-Сенс»). Амплификацию гена 16S рРНК проводили с праймерами 27f и 1492g. Очищенный ПЦР-продукт секвенировали с использованием указанных выше праймеров. Выравнивание и объединение последовательностей ДНК проводили с использованием пакета программ Staden Package 5. Сравнительный анализ секвенированных последовательностей проводили с помощью программы NCBI Blast. Для филогенетического анализа использовали программу Blast Tree, представленную на сайте GenBank (метод neighbor-joining). Сиквенсы гена 16S рРНК типовых культур бактерий рода *Pseudomonas* получали из баз данных GenBank [6].

**Фенотипические исследования.** Культуральные и морфологические свойства бактерий изучали, выращивая их на мясо-пептонном агаре, а также на средах, оптимальных для биосинтеза пигментов фенолиновой природы [7]. Чашки с посевами инкубировали при температуре 28°C 24 ч. Исследовали окисление глюкозы и маннита на среде Хью и Ливсона [7]. Для изучения оксидазной реакции использовали 1% раствор солянокислого диметилпарафенил-н-диамина. Наличие протеаз, липаз, лецитиназ, левансахараз, способности к денитрификации изучали общепринятыми

методами [7]. Ассимиляцию различных органических соединений изучали на синтетической среде Козера с добавлением 0,1% соответствующего С-источника [7].

Антагонистическую активность штамма *Pseudomonas* sp. 2303 изучали на твердой агаризованной среде Гаузе №2 методом радиальных штрихов. В качестве тест-культур использовали международные референс-штаммы микроорганизмов, необходимые для проведения микробиологического контроля, из Украинской коллекции микроорганизмов: *Bacillus cereus* В-911, *B. cereus* В-903, *B. subtilis* В-901, *B. subtilis* В-902, *Kocuria varians* Ас-613, *Mycobacterium fortuitum* Ас-396, *M. phlei* Ас-399, *M. phlei* Ас-402, *M. smegmatis* В-917, *M. smegmatis* Ас-403, *M. smegmatis* Ас-417, *Staphylococcus aureus* В-918, *S. aureus* В-4001, *Escherichia coli* В-906, *Proteus vulgaris* В-905, *Pseudomonas aeruginosa* В-900, *P. aeruginosa* В-907, *Salmonella enterica* В-921, *Candida albicans* Y-2681, *C. utilis* Y-984; штаммы из коллекции отдела антибиотиков ИМВ НАНУ: *Fusarium graminearum* 08G, *F. poae* 09G, *F. solani* 11Z, *Bipolaris sorokiniana* 10Z, *Pythium sylvaticum* 11Z, *Gaeumannomyces graminis* 10Z.

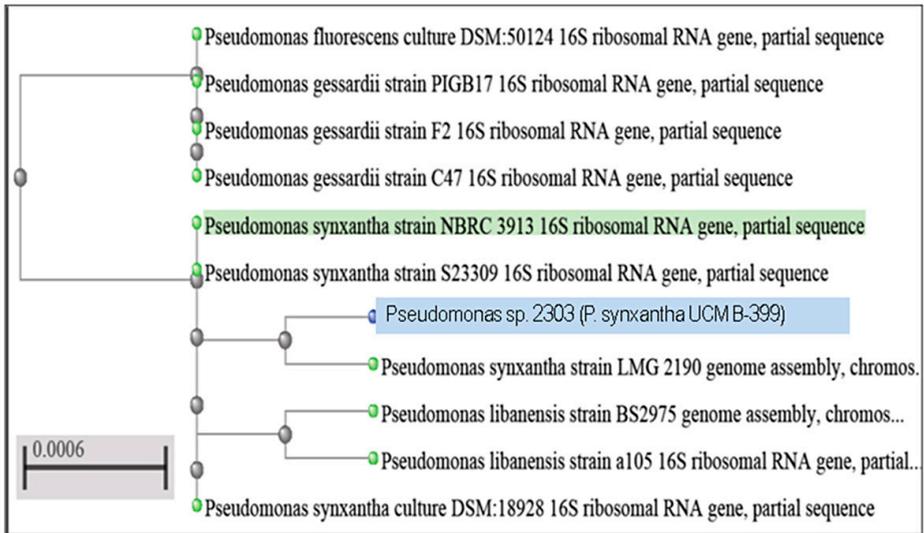
*Жирнокислотный состав* изучали методом хромато-масс-спектрометрии. Исследования проводили на хроматографе Agilent 6890N с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5973 inert, капиллярная колонка HP-5MS (J&W Scientific, USA). Газ-носитель – гелий; начальная температура колонки – 150°C; конечная температура колонки – 250°C; температурный градиент – 4°C/мин; температура интерфейса – 280°C; тип ионизации – электронный удар; энергия ионизации – 70 эВ. Обработке данных хромато-масс-спектрометрического анализа проводили с помощью компьютерной программы ChemStation и интегрированной базы данных масс-спектров NIST 02, а также стандарта метиловых эфиров жирных кислот бактерий (Supelco, № 4708-U, USA).

*Электронно-микроскопические исследования* проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии с помощью микроскопа JEM-1400 («Jeol», Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ, используя контрастирование образцов 1% раствором уранилацетата [6].

*Статистика.* Результаты обрабатывали статистически с использованием пакетов программ Microsoft Excel'2010. В таблицах приведены средние значения, являющиеся достоверными при  $p < 0,05$ .

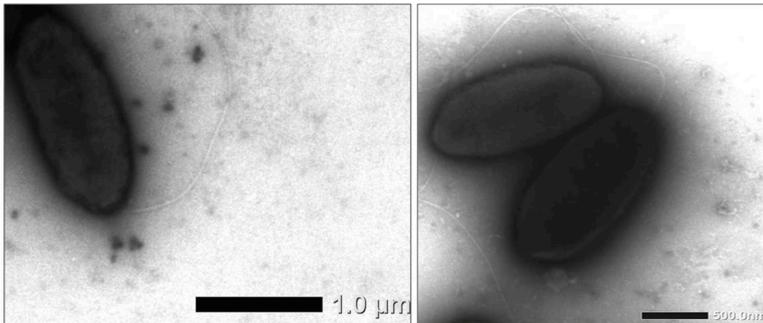
**Результаты.** Сравнительный анализ последовательностей 16S рРНК исследуемого штамма *Pseudomonas* sp. 2303 (рис. 1) и представителей рода *Pseudomonas* выявил 100% идентичности с геном типового штамма *P. synxantha* NBRC 3913 (ATCC 9890<sup>T</sup>), а также с флюоресцирующими видами *P. gessardii* и *P. libanensis*. Однако наиболее генетически родственными оказались представители *P. synxantha*.

Исходя из данных сиквенса гена 16S рРНК, штамм *Pseudomonas* sp. 2303 был отнесен нами к виду *P. synxantha*. Полученный сиквенс был задепонирован в базе данных GenBank (номер MF196188), а штамм зарегистрирован в Украинской коллекции микроорганизмов как *P. synxantha* УКМ В-399.



**Рис. 1. Филогенетическое положение штамма *Pseudomonas* sp. 2303, основанное на сиквенсе гена 16S рРНК**

Подобно другим представителям рода *Pseudomonas*, исследуемые бактерии представляли собой грамотрицательные оксидазоположительные палочки с дыхательным типом метаболизма, размеры которых составляли  $1,89 \pm 0,25 \times 0,87 \pm 0,10$  мкм (рис. 2).



**Рис. 2. Электронная микроскопия клеток штамма *P. synxantha* УКМ В-399**

ГЦ содержание ДНК у *Pseudomonas* sp. 2303 составляло 61,2 мол-%, у генетически и фенотипически близких *P. gessardii* и *P. libanensis* [8, 9] – 58,1 мол-%.

Подобно двум вышеназванным видам, клетки штамма 2303 имели один жгутик (рис. 2). Они гидролизовали желатин, были способны к денитрификации, обладали лецитиназной и липазной активностью. В качестве единственного С-источника усваивали d-глюкозу, d-ксилозу, l-арабинозу, d-маннозу, d-фруктозу, трегалозу, мальтозу, ацетат, пропионат, малонат, сукцинат, фумарат, цитрат, пируват, маннит, глицерин, ацетамид, l-аланин, l-лейцин, l-валин, l-лизин, l-аргинин, l-гистидин, l-тирозин, l-триптофан, l-пролин, l-тирозин и l-фенилаланин.

Не образовывали леван из сахарозы, а также не усваивали: d-рамнозу, d-галактозу, целлобиозу, метанол, этанол, пропанол, n-бутанол, инулин, салицин, крахмал, гликолат, этиленгликоль, сорбит, фенилацетат, глицин и гипурат.

Согласно литературным данным [7, 10], наиболее распространенными у представителей рода *Pseudomonas* являются жирные кислоты с прямой цепью C16:0, а также ненасыщенные с прямой цепью C16:1, C18:1 и гидроксильированные жирные кислоты 3ОН C10:0 и 2ОН C12:0. Данные жирнокислотного анализа штамма *P. synxantha* В-399 приведены в табл. 1.

**Таблица 1**

**Содержание жирных кислот у штамма *P. synxantha* УКМ В-399 и сравнительный анализ с близкородственными видами**

Жирные кислоты	Содержание жирных кислот в штаммах, %			
	<i>P. synxantha</i> УКМ В-399	<i>P. synxantha</i> ATCC 9890 <sup>T</sup>	<i>P. libanensis</i> CCUG 43190 <sup>T</sup>	<i>P. gessardii</i> CCUG 43164 <sup>T</sup>
C12:0	2,28	3,60	3,30	2,80
2ОН C12:0	2,10	5,50	5,90	6,50
C14:0	0,25	0,40	0,50	1,0
C16:0	32,90	25,70	30,0	25,5
C16:1 (w7)	30,91	21,80	13,6	26,5
C16:1 (w9)	3,33	нет данных	нет данных	нет данных
C17:0	0,1	0,3	0,4	0,7
ΔC17:0 (cis 9,10 C17:0)	12,2	13,1	26,1	13,0
C18:0	1,39	0,8	0,4	0,3
transC18:1	12,8	14,6	7,1	5,9

Анализ жирнокислотного состава исследуемого штамма показал, что содержание C12:0, C14:0, ΔC17:0 и transC18:1 кислот было приблизительно одинаковым у *P. synxantha* В-399 и типового штамма *P. synxantha* ATCC 9890<sup>T</sup>. Некоторые незначительные отличия наблюдали в содержании 2ОН C12:0, C16:0 и C16:1 кислот, что может обуславливаться штаммоспецифичностью и условиями выращивания.

При изучении антагонистической активности штамма *P. synxantha* В-399 было установлено, что он подавлял рост широкого ряда различных микроорганизмов (табл. 2).

Штамм *P. synxantha* В-399 характеризовался умеренной активностью по отношению к большинству бактерий, но при этом обладал высоким ингибирующим действием на многие фитопатогенные грибы. Отдельно были определены антагонистические свойства *P. synxantha* В-399 по отношению к микобактериям (табл. 3). Более подробно этот вопрос будет рассмотрен в разделе «Обсуждение».

Отметим, что ранее нами была установлена высокая антагонистическая активность штамма В-399 к фитопатогенным бактериям, а также цианобактериям (*Microcystis aeruginosa*, *Anabaena variabilis*, *Nostoc linckia*), вызывающим «цветение» воды. В значительной степени в основе этого эффекта лежит синтез антибиотически активного пигмента феназин-1-карбоновой кислоты [11].

**Таблица 2**

**Антагонистическая активность штамма *P. synxantha* УКМ В-399**

№ п/п	Название штамма и его номер в УКМ	Зона задержки роста, мм
<b>Грамположительные бактерии</b>		
1	<i>Bacillus cereus</i> В-911	20
2	<i>Bacillus cereus</i> В-903	17
3	<i>Bacillus subtilis</i> В-901	15
4	<i>Bacillus subtilis</i> В-902	14
5	<i>Kocuria (Micrococcus) varians</i> Ас-613	23
6	<i>Staphylococcus aureus</i> В-918	16
7	<i>Staphylococcus aureus</i> В-4001	17
<b>Грамотрицательные бактерии</b>		
8	<i>Escherichia coli</i> В-906	9
9	<i>Proteus vulgaris</i> В-905	17
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> В-900	11
11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> В-907	15
12	<i>Salmonella enterica</i> В-921	0
<b>Грибы</b>		
13	<i>Candida albicans</i> Y-2681	25
14	<i>Candida utilis</i> Y-984	23
15	<i>Fusarium graminearum</i> 08G	17
16	<i>Fusarium poae</i> 09G	19
17	<i>Fusarium solani</i> 11Z	16
18	<i>Bipolaris sorokiniana</i> 10Z	19
19	<i>Pythium sylvaticum</i> 11Z	18
20	<i>Gaeumannomyces graminis</i> 10Z	20

**Таблица 3**

**Антагонистическая активность штамма *P. synxantha* УКМ В-399 по отношению к микобактериям**

№ п/п	Название штамма и его номер в УКМ	Зона задержки роста, мм
1	<i>Mycobacterium fortuitum</i> Ас-396	14
2	<i>Mycobacterium phlei</i> Ас-399	15
3	<i>Mycobacterium phlei</i> Ас-402	16
4	<i>Mycobacterium smegmatis</i> В-917	15
5	<i>Mycobacterium smegmatis</i> Ас-403	16
6	<i>Mycobacterium smegmatis</i> Ас-417	15

**Обсуждение.** Вид *P. synxantha* (Ehrenberg 1840) Holland 1920 описан Хейнсом и Беркхольдером в 1957 г. и позже включен в Одобренные списки видовых названий [12]. Представители этого вида принадлежат к флюоресцирующей группе рода *Pseudomonas*. Их отличительной, а до недавнего времени практически единственной известной особенностью, является способность к образованию желто-оранжевой окраски при росте на сливках или молоке [13]. Однако, несмотря на более чем столетнюю историю, детальная фенотипическая характеристика вида и критерии отличия штаммов от других представителей флюоресцирующих псевдомонад не приведены в определителях, а идентификация исследуемых изолятов, как правило, основывается только на данных сиквенса 16S РНК [14].

Отметим, что штамм *P. synxantha* В-399, а также представители видов *P. libanensis* и *P. gessardii* были выделены из водных источников: *P. synxantha* В-399 – из скважины бальнеологического источника, *P. libanensis* – из родниковой воды, *P. gessardii* – из природного минерального источника.

Возникает вопрос: существуют ли какие-либо фенотипические особенности, характерные для вида *P. synxantha* и позволяющие отличать его от близкородственных флюоресцирующих штаммов псевдомонад?

В табл. 4 представлены отличия между видами *P. gessardii*, *P. libanensis* и штаммом *P. synxantha* В-399, выявленные нами на основании анализа данных литературы и изучения свойств штамма В-399.

**Таблица 4**

**Фенотипические отличия между штаммами *P. synxantha* В-399, *P. gessardii* и *P. libaniensis***

Исследуемый признак	<i>P.synxantha</i> В-399	<i>P.gessardii</i> [8]	<i>P.libaniensis</i> [9]
Синтез феназин-1-карбоновой кислоты	+	-	-
Образование левана из сахарозы	-	+	+
Образование желтого пигмента на молоке	+	не описано	не описано
Усвоение			
d-ксилозы	+	+	-
l-арабинозы	+	-	+
d-галактозы	-	+	+
мезо-тартрата	+	-	-
сорбита	-	-	+
l-триптофана	+	-	-

К основным отличиям относились: синтез феназин-1-карбоновой кислоты, неспособность к образованию левана из сахарозы, усвоение ксилозы, арабинозы, мезо-тартрата и триптофана. Несмотря на то, что в литературе описаны штаммы *P. synxantha*, образующие феназин-1-карбоновую кислоту, неизвестно, способен ли к синтезу этого метаболита типовой штамм этого вида.

При анализе жирнокислотных профилей (табл. 1) каких-либо существенных диагностически ценных отличий обнаружить у близкородственных видов не удалось. Исключение составляла лишь transC18:1 кислота, содержание которой у типового штамма *P. synxantha* ATCC 9890<sup>T</sup> и исследуемого *P. synxantha* УКМ В-399 приблизительно в два раза выше, чем у других рассматриваемых видов.

Отметим, что, к сожалению, в нашем распоряжении не было типового штамма *P. synxantha* ATCC 9890<sup>T</sup>, что придало бы полученным данным более универсальный характер.

Особого рассмотрения заслуживает вопрос об антимикробной активности и экологии *P. synxantha*. В литературе приводятся данные о штамме

*P. synxantha* BG33R, изолированном из ризосферы персиковых деревьев и способном убивать яйца кольцевой нематоды *Mesocriconema xenoplax* [15]. Ранее нами также была установлена активность штамма *P. synxantha* УКМ В-399 по отношению к комплексу фитопаразитических и сапробиотических нематод, в том числе по отношению к картофельной нематоды *Ditylenchus destructor*. Штамм В-399 проявлял антагонистическую активность, вызывая отталкивание нематод от газона бактерий, более того, при этом наблюдалась гибель 10 – 15% нематод. По-видимому, за наблюдаемый эффект ответственна феназин-1-карбоновая кислота, что было показано нами ранее, но возможно – и другие образуемые бактериями биологически активные соединения.

В работе Mukherjee с соавторами [16] сообщается о выделении из штамма *P. synxantha* NAK1 длинноцепочечного углеводородного вещества – биосурфактанта, обладающего активностью к *Mycobacterium smegmatis* и *M. tuberculosis*, что побудило нас изучить влияние штамма В-399 на некоторые виды микобактерий (табл. 3). В наших опытах изучаемый продуцент ингибировал рост всех 6 испытанных штаммов трех видов микобактерий. Можно предположить, что этот эффект обусловлен синтезом соединения, подобного или близкого по структуре описанному выше, что требует экспериментальной проверки.

Значительную роль в экологии ризосферных псевдомонад играет образование феназин-1-карбоновой кислоты [17]. Недавние исследования разнообразия микроорганизмов в засушливых регионах США (более чем 22000 км<sup>2</sup> Колумбийского плато) выявили популяции феназинсинтезирующих бактерий на корнях зерновых культур и местных растений. Согласно данным анализа 16S рРНК, все изоляты принадлежали к видам *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. orientalis*, *P. libanensis* и *P. synxantha*. Было показано, что колонизация растений этими псевдомонадами была обратно пропорциональна ежегодному выпадению осадков, то есть в более засушливые периоды колонизация возрастала. Mavrodí и его коллеги [18] установили, что феназинсинтезирующие псевдомонады адаптированы для выживания в засушливых условиях из-за их способности сопротивляться высыханию посредством образования биопленки. При этом было продемонстрировано, что феназин-1-карбоновая кислота может накапливаться в окружающей среде в количествах, достаточных не только для внутривидовой сигнализации (кворум-сенсинга, QS), но и для прямого ингибирования чувствительных организмов [18, 19].

Таким образом, в результате полифазного таксономического анализа проведена ревизия исследуемого штамма *Pseudomonas* sp. 2303, который был отнесен к виду *P. synxantha*. Предложен ряд диагностических признаков: синтез феназин-1-карбоновой кислоты, неспособность к образованию левана из сахарозы, усвоение некоторых источников углерода (1-арабинозы, мезо-гартрата, 1-триптофана), позволяющих отличать вид *P. synxantha* от близкородственных ему видов.

# ПОЛІФАЗНИЙ ТАКСОНОМІЧНИЙ АНАЛІЗ ТА БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ СПОЛУКИ ШТАМУ *PSEUDOMONAS* SP. 2303

*В.В. Клочко, К.О. Чугунова, Л.В. Авдєєва*

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна*

## Резюме

**Мета.** Визначення таксономічного статусу штаму *Pseudomonas* sp. 2303 і вивчення його біологічної активності. **Методи.** Виділення бактеріальної ДНК, ампліфікація і сіквенс гена 16S рРНК, вивчення культуральних, морфологічних, фізіолого-біохімічних властивостей і антагоністичної активності. Трансмісійна електронна мікроскопія, газова хромато-мас-спектрометрія. **Результати.** Філогенетичний аналіз послідовності гена 16S рРНК штаму *Pseudomonas* sp. 2303 (1334 п.н.) і представників роду *Pseudomonas* виявив 100% ідентичності з геном типового штаму *P. synxantha* ATCC 9890<sup>T</sup>, а також з флюоресціюючими видами *P. gessardii* і *P. libanensis*. Останні відрізнялися від досліджуваного штаму за своїми фенотиповими властивостями. Жирнокислотний аналіз показав, що до складу *Pseudomonas* sp. 2303 входять характерні для псевдомонад C16:0, C16:1, C18:1, 2ОНC12:0 кислоти, вміст яких був подібний до такого ж у типового штаму *P. synxantha*. Штам *Pseudomonas* sp. 2303 характеризувався високою антагоністичною активністю по відношенню до бактерій і грибів. **Висновки.** На основі результатів поліфазного таксономічного аналізу штаму *Pseudomonas* sp. 2303 було віднесено до виду *P. synxantha* і включено в Українську колекцію мікроорганізмів як *P. synxantha* УКМ В-399 (сіквенс задепоновано в Genbank під номером MF196188). Запропоновано ряд діагностичних ознак (синтез феназин-1-карбонової кислоти, нездатність до утворення левану з сахарози, засвоєння деяких джерел вуглецю), які дають змогу відрізнити вид *P. synxantha* від близькостпоріднених йому видів.

*Ключові слова:* поліфазний таксономічний аналіз, види *Pseudomonas synxantha*, *P. gessardii*, *P. libanensis*, жирнокислотний склад, антагонізм, синтез феназин-1-карбонової кислоти.

# POLYPHASIC TAXONOMIC ANALYSIS AND BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF STRAIN *PSEUDOMONAS* SP. 2303

*V.V. Klochko, K.O. Chugunova, L.V. Avdeeva*

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine*

## Summary

**Purpose.** Determination of *Pseudomonas* sp. 2303 taxonomic status and study of its biological activity. **Methods.** Isolation of bacterial DNA, amplification and sequence of 16S rRNA gene, study of cultural, morphological, physiological and biochemical properties of strain and its antagonistic activity. Transmission electronic microscopy, GC/MS-analysis. **Results.** Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence of strain *Pseudomonas* sp. 2303 (1334 bp) in comparison with other genus *Pseudomonas* representa-

tives established 100% of identity with the type strain *P. synxantha* ATCC 9890<sup>T</sup> gene and with the fluorescent species *P. gessardii* and *P. libanensis*. The latter differed from the studied strain in their phenotypic properties. The fatty acids analysis has shown that *Pseudomonas* sp. 2303 had in its composition characteristic for pseudomonads C16:0, C16:1, C18:1, 2OHC12:0 fatty acids content of which was similar with the type strain *P. synxantha* ATCC 9890<sup>T</sup>. Strain *Pseudomonas* sp. 2303 had shown high activity against bacteria and fungi. **Conclusions.** According to polyphasic taxonomic analysis results the studied strain *Pseudomonas* sp. 2303 was identified as *P. synxantha* and included to Ukrainian Collection of Microorganisms as *P. synxantha* UCM B-399 (accession number in Genbank – MF196188). Some diagnostic characteristics were proposed (phenazine-1-carboxylic acid synthesis, inability of levan production from sucrose, assimilation of some carbon sources) which allow to differ *P. synxantha* from closely related species.

**Keywords:** polyphasic taxonomic analysis, *Pseudomonas synxantha*, *P. gessardii*, *P. libanensis*, fatty acids composition, antagonistic activity, phenazine-1-carboxylic acid synthesis.

1. Palleroni N. The *Pseudomonas* Story. Environ. Microbiol. 2010; 12(6): 1377 – 83.
2. Bernd H, Rehm A, editors. *Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory*. Verlag GmbH. Wiley-VCH; 2008.
3. Parte A. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. Nucleic Acids Res. 2014; 613 – 16.
4. Kahlon R. *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology*. Springer International Publishing Switzerland; 2016.
5. Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev. 1996; 602:407–38.
6. Kiprianova EA, Klochko VV, Zelena LB, Churkina LN, Avdeeva LV. *Pseudomonas batumici* sp. nov., the antibiotic-producing bacteria isolated from soil of the Caucasus Black Sea coast. Microbiol Z. 2011; 73(5): 3–8.
7. Smirnov VV, Kiprianova EA. [Bacteria of the *Pseudomonas* genus]. Naukova dumka; 1990. Russian.
8. Verhille S, Baida N, Dabboussi F, Hamze M, Izard D, Leclerc H. *Pseudomonas gessardii* sp. nov. and *Pseudomonas migulae* sp. nov., two new species isolated from natural mineral waters. Int J Syst Bacteriol. 1999; 49(4):1559-72.
9. Dabboussi F, Hamze M, Elomari M, Verhille S, Baida N, Izard D, Leclerc H. *Pseudomonas libanensis* sp. nov., a new species isolated from Lebanese spring waters. Int. J Syst Bacteriology. 1999; 49: 1091-101.
10. Ikemoto S, Kuraishi H, Komagata K, Ajuma R, Suto T, Murooka H. Cellular fatty acid composition in *Pseudomonas* species. J Gen Appl Microbiol. 1978; 24:199–213.
11. Klochko VV, Zelena LB, Chugunova KO, Tsarenko PM, Kriuchkova LO, Pasichnyk LA, Avdeeva LV, Pidgorsky VS. [*Pseudomonas* sp. strain 2303 as active phytopathogenic antagonist and its antibiotic characteristics]. Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine. 2014; 10:161 – 166. Ukrainian.
12. Approved lists of bacterial names. Int J Syst. Bacteriol. 1980; 30: 225-420.
13. Brenner D, Krieg N, Staley J, Garrity G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. v. 2, parts A, B and C, Springer-Verlag, New York, NY; 2005.

14. Anzai Y, Kim H, Park J, Wakabayashi H, Oyaizu H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000; 50:1563–89.
15. Wechter W, Begum D, Presting G, Kim J, Wing R, Kluepfel D. Physical mapping, BAC-end sequence analysis, and marker tagging of the soilborne nematocidal bacterium, *Pseudomonas synxantha* BG33R. *OMICS.* 2002; 6: 11-21.
16. Mukherjee K, Mandal S, Mukhopadhyay B, Mandal N, Sil A. Bioactive compound from *Pseudomonas synxantha* inhibits the growth of *Mycobacteria*. *Microbiol Res.* 2014; 169:794–802.
17. Chincholkar S, Thomashow L, editors. *Microbial Phenazines: Biosynthesis, Agriculture and Health.* Springer-Verlag Berlin: Heidelberg; 2013.
18. Mavrodi D, Mavrodi O, Parejko J. Accumulation of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid in the rhizosphere of dryland cereals. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78:804–812.
19. Mavrodi O, Mavrodi D, Parejko J. Irrigation differentially impacts populations of indigenous antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in the rhizosphere of wheat. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78:3214–20.

Отримано 13.07.2017